

**Über Fermentaktivitäten
im menschlichen Muskel**

Erna Mayer

Druck: Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 21777



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

ÜBER FERMENTAKTIVITÄTEN
IM MENSCHLICHEN MUSKEL

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Erna Mayer
aus Stuttgart

München 1959



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. SEITZ

Dekan: Professor Dr. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 28. JULI 1959

Herrn Professor Dr. W. SEITZ sei an dieser Stelle herzlich
gedankt für die Übernahme des Referates, sowie Herrn
Professor Dr. K. STUHLFAUTH für die Überlassung des
Themas.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Allgemeine Vorbemerkungen	7
II. Erklärung der verwendeten Abkürzungen	8
III. Eigene Untersuchungen	9
A. Zur Methodik:	
1) Aufarbeitung des Gewebsmaterials	9
2) Dauer des Homogenisierens	9
3) Behandlung der Fermente	10
4) Konzentration des Homogenats	10
5) Schaffung optimaler Testbedingungen	10
6) Konzentration der Fermente, Cofermente und Substrate im Test	10
7) Spezifität der Tests	11
8) Stabilität der Homogenate	11
B. Fermentbestimmungsmethoden	
a) Prinzip der Fermentbestimmungen	12
b) Durchführung der Fermentbestimmungen	12
1) MDH	12
2) Aldolase	13
3) PÜ I	15
4) PGADH	16
C. Durchführung der Tests	18
D. Erklärung des Photometers	19
E. Berechnung der Fermentaktivitäten	19
F. Einteilung des getesteten Muskelgewebes	20
G. Ergebnisse	20
IV. Diskussion	30
V. Zusammenfassung	35
VI. Literaturverzeichnis	36
VII. Lebenslauf	37

I. ALLGEMEINE VORBEMERKUNGEN

Bestimmungen der Fermentaktivitäten wurden seither fast ausschliesslich an tierischen Geweben durchgeführt; doch sind die Vorgänge und Reaktionen im tierischen Muskel nicht ohne weiteres mit denen des menschlichen Muskels gleichzusetzen. (Eigene Versuche ergaben beim Mausmuskel etwa die doppelten Fermentaktivitäten gegenüber dem gesunden menschlichen Muskel).

Die Hinweise in der Literatur über Messungen von Fermentaktivitäten an menschlichem Muskelgewebe sind nicht sehr zahlreich, so dass nur auf wenige Angaben Bezug genommen werden kann:

W. Doden und H.J. Hillenbrand (1) fanden "bei Untersuchungen an atrophischen tierischen und menschlichen Muskeln, dass die Fähigkeit des Muskels zur Kreatinsynthese ein Mass für seinen Funktionszustand ist. (Das Kreatin kann im Kalt- und Warmblütermuskel durch ein Kreatinaufbauendes Ferment gebildet werden). Atrophische Muskeln verlieren infolge Schädigung des zur Gruppe der Myosineiweisskörper gehörenden Apo - Ferments die Fähigkeit, aus Arginin und Histidin Kreatin zu bilden. Das hitzebeständige, niedermolekulare Ferment bleibt meistens aktiv. - Der Kreatingehalt war in der Muskulatur aller Patienten mit Arteriosklerose deutlich erniedrigt (bis zu 50 % der Norm). Das kreatinaufbauende Ferment ist sowohl bei den Arteriosklerose-, als auch bei den Endangitispatienten wesentlich geschädigt".

Die Problemstellung bei dieser Arbeit war nun folgende: Es sollte untersucht werden, ob beim gesunden menschlichen Muskel im Lauf des Alters eine Schädigung, bzw. Abnahme der Fermentaktivitäten eintritt, mit anderen Worten, ob die Leistungsabnahme des alternden Menschen durch eine Abnahme von Enzymeiweiss bedingt ist. Ausserdem interessierte die Frage, ob die mangelhafte Glukoseverwertung beim diabetischen Muskel eine Folge herabgesetzter Fermentaktivität ist.

Im Lauf der Arbeit tauchte eine weitere Frage auf: Nämlich ob die Fermentaktivitäten im Muskelgewebe bei entzündlichen Vorgängen (Osteomyelitis) und bei Durchblutungsstörungen verändert sind.

Im Folgenden sind die Methodik und die Ergebnisse unserer Arbeit dargestellt.

II. ERKLÄRUNG DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

MDH	= Milchsäuredehydrase
PÜ I	= Phosphatübertragendes Ferment I
PGADH	= Triosephosphatdehydrogenase = Phosphoglycerindehydrase = oxydierendes Ferment
DPN	= Diphosphopyridinnukleotid
GDH	= Glycerophosphatdehydrase
FDP	= Fruktose 1-6- diphosphat (Na)
FE	= Fermenteinheiten

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Zur Methodik:

1) AUFARBEITUNG DES GEWEBSMATERIALS.

Das Muskelgewebe konnte direkt bei Operation auf der chirurgischen Abteilung unserer Klinik gewonnen werden.⁺⁾ Es wurde sofort in eine Schale gebracht, die mit einer Gefrier Mischung umgeben war und gleich darauf mit eisgekühlter physiologischer Na-Cl-Lösung gespült, um die Blutreste zu entfernen. 200 mg des Gewebes wurden auf einer Mikrowaage genau abgewogen, und das Abgewogene in einem eisgekühlten Porzellanmörser zerrieben. Nach Zugabe von 5 ccm eisgekühltem Na-Cl-Phosphat-Puffer erfolgte die weitere Verarbeitung des Homogenats in einem Mikrohomogenisator, der ebenfalls während des ganzen Homogenisierens mit einer Kältemischung gekühlt wurde.

Zusammensetzung des Na-Cl-Phosphat-Puffers (nach D. Crandall und Halikis, 2)

Na Cl	:	0,127 m	= 7,429 g	} ad 1000 ccm H ₂ O
KH ₂ PO ₄	:	0,0083 m	= 1,129 g	
K ₂ HPO ₄	:	0,067 m	= 11,685 g	

2) DAUER DES HOMOGENISIERENS:

Für das oxydierende Ferment und für das phosphatübertragende Ferment ergaben sich bei einer Arbeitsdauer von zwei Minuten im Überstand 10 - 20 % geringere Fermentkonzentrationen als im Gesamthomogenat. Wenn

^{+) Herr Professor Dr. H. BRONNER, Direktor der Chirurgischen Universitäts-Poliklinik und Herrn Professor Dr. V. STRUPPLER sei an dieser Stelle herzlich gedankt für die liebenswürdige Unterstützung unserer Arbeit.}

dagegen statt zwei Minuten sechs Minuten lang homogenisiert wurde, war die Konzentration im Überstand ebenso hoch wie im Gesamthomogenat, weshalb wir bei unseren Versuchen eine Arbeitsdauer von sechs Minuten beibehielten.

Für Milchsäurehydase und Aldolase hatte sich eine Arbeitsdauer von zwei Minuten als genügend erwiesen.

3) BEHANDLUNG DER FERMENTE:

Besonders war darauf zu achten, dass sich das zu verarbeitende Gewebe beim Homogenisieren nicht erwärmte. Vorversuche ergaben, dass bei Erwärmung die Aktivitäten der Fermente wesentlich abnehmen.

4) KONZENTRATION DES HOMOGENATS

Vom Homogenat wurde mit einer Mikro-Spezialpipette 1,5 ccm entnommen und ad 5 ccm Na-Cl-Phosphatpuffer (Crandall und Halikis) in ein vorgekühltes Zentrifugenglas gegeben (zur Herstellung einer Verdünnung von 1 : 1.000) und 10 Minuten lang bei 15.000 Umdrehungen in einer Kältezentrifuge zentrifugiert. (Für den PÜ - Test wurde entsprechend eine Verdünnung von 1 : 100 hergestellt, alle übrigen Tests nahmen wir bei Verdünnung von 1 : 1.000 vor. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand in ein ebenfalls von Kältemischung umgebenes Gefäß abpipettiert MDH, Aldolase, PÜ I und PGADH wurden sämtlich aus dem Überstand getestet.

5) SCHAFFUNG OPTIMALER TESTBEDINGUNGEN:

Mit Hilfe reiner kristalliner Fermente wurde die für den optimalen Ablauf der Reaktion erforderliche Substratkonzentration bestimmt.

6) KONZENTRATION DER FERMENTE, COFERMENTE UND SUBSTRATE IM TEST:

Wenn der Test mit Substrat und Coferment gesättigt ist, wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch die vorhandene Fermentkonzentration be-

stimmt. Diese ist bei bestimmten Konzentrationen der Abnahme des DPNH pro Minute = ΔE proportional.

Wir fanden optimale Bedingungen bei einem ΔE von 0,005 - 0,040 pro Minute. In diesem Bereich erfolgt die Abnahme der Extinktion in einem Zeitraum von 10 - 20 Minuten kontinuierlich, so dass exakte Messungen möglich sind.

Im zusammengesetzten optischen Test muss das kristallin zugesetzte Ferment gegenüber dem zu testenden im Überschuss sein. Die erforderliche Menge wurde für den jeweiligen Test bestimmt.

7) SPEZIFITÄT DER TESTS:

Da DPN das Coferment für viele Gewebshydrasen ist, so ist die Spezifität eines Tests nur dann gewährleistet, wenn er nur ein einziges Substrat enthält. Da das zu testende Material nie rein von Substraten anderer Fermente ist, lassen wir vor dem Zusatz des spezifischen Substrats die Reaktion der Fermente des Homogenats mit dessen Substraten im Überschuss von DPNH ablaufen. Da diese Substrate nur in geringer Konzentration vorhanden sind, dauert dieser Vorlauf 60 - 90 Minuten. Erst wenn keine Extinktionsabnahme mehr erfolgt, wird die Reaktion mit dem jeweiligen Substrat gestartet. Da als unspezifisches Substrat vor allem die Brenztraubensäure in Betracht kommt, liess sich eine Verkürzung des Vorlaufs auf ca. 10 Minuten durch Zusatz von 0,01 - 0,02 ml MDH erzielen.

8) STABILITÄT DER HOMOGENATE:

Die Aktivität der getesteten Fermente war während der Versuchsdauer von ein bis eineinhalb Stunden konstant.

B. Fermentbestimmungsmethoden

a) PRINZIP DER FERMENTBESTIMMUNGEN:

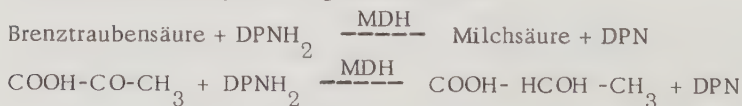
Alle von uns durchgeführten Fermentmethoden beruhen auf dem Prinzip der von Warburg (3) entwickelten optischen Tests. Diese gründen sich darauf, dass die reduzierte Form der Pyridincofermente durch eine charakteristische Absorptionsbande (bei $340 \text{ m}\mu = 340 \text{ nm}$) im UV ausgezeichnet ist, während das nicht hydrierte Coferment bei dieser Wellenlänge nicht absorbiert. Wenn nun durch die Wirkung spezifischer pyridinabhängiger Fermente Substrate reduziert oder oxydiert werden, wird DPN hydriert oder DPNH dehydriert. Da das Coferment an diesen Reaktionen im stöchiometrischen Verhältnis beteiligt ist, ist die Zu- oder Abnahme der Extinktion des DPNH ein Mass der betr. Fermentaktivität (= einfacher Fermenttest). Da aber sowohl in der Glykolyse wie im Zitronensäurezyklus nur einige Fermente mit DPN als wasserstoffübertragendes Coferment arbeiten, misst man andere Cofermente, indem man sie mit diesen wasserstoffübertragenden Reaktionen koppelt (zusammengesetzter Fermenttest). So konnten bei vorliegenden Versuchen die MDH als DPN - abhängiges Ferment direkt getestet werden, während Aldolase, Triosephosphatdehydrogenase, und das phosphatübertragende Ferment I im zusammengesetzten Test bestimmt wurden.

b) DURCHFÜHRUNG DER FERMENTBESTIMMUNGEN:

1) Milchsäuredehydrase = MDH

Zur Theorie des Tests:

Das Ferment katalysiert folgende Reaktion:



Das Gleichgewicht der Reaktion liegt nahezu vollkommen auf der Seite der Milchsäure. Während des Reaktionsablaufs verschwindet DPNH und damit auch die Lichtabsorption bei 366 nm. Die Geschwindigkeit dieser Abnahme ist das Mass für die Fermentaktivität.

Zusammensetzung der Testlösung:

Wir führten den Test in Anlehnung an Kubowitz und Ott (4) folgendermassen durch:⁺⁾

⁺⁺⁾ Na-Pyropuffer; m/15; $P_H : 8,3$	= 1,00 ccm
Brenztraubensaures Na; m/10	= 0,15 ccm
DPNH ₂ , 10 mg/ccm	= 0,05 ccm
Homogenat	= 0,10 ccm
Aqua dest.	ad 2,50 ccm

2) Aldolase

Zur Theorie des Tests:

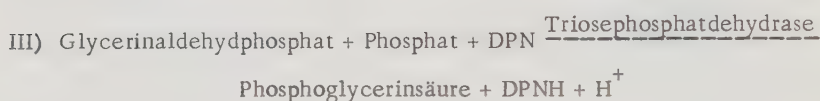
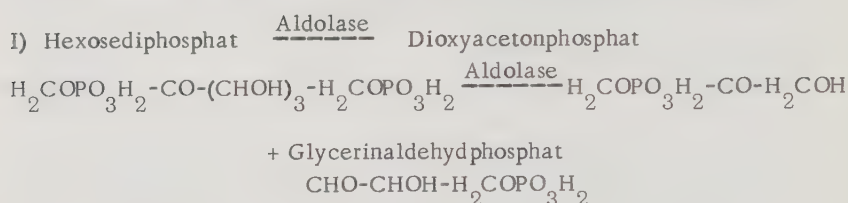
Der Abbau der Hexosen zu Triosen verläuft im Organismus nach folgendem Schema:

Durch das Ferment Aldolase wird Fruktose 1-6-Diphosphat (= FDP) in Dioxyacetonphosphat und Glycerinaldehydphosphat gespalten (siehe I). Im Gewebe ist ein Ferment vorhanden, die Trioseisomerase, welche bewirkt, dass im Gleichgewichtszustand etwa 97 % als Dioxyacetonphosphat vorhanden ist (siehe II). - Dioxyacetonphosphat wird weiterhin durch ein

^{+) Kubowitz und Ott (4) haben die ersten spektrophotometrischen Untersuchungen von Euler und Mitarbeitern (5) und Meyerhof und Ohlmeyer (6) erweitert und optimale Bedingungen für die Durchführung des Tests angegeben.}

<sup>++) Herstellung des Pyropuffers:
 2,973 g Natriumphosphat $[Na_4P_2O_7(10 H_2O)] + 0,05 g$ Glykokoll gelöst in 100 ccm H_2O , mit HCl auf den gewünschten P_H -Wert eingestellt. Nach Angaben von Kubowitz und Ott (4), hat Na -Pyrophosphat $P_H 8,5$ gegenüber Orthophosphat $P_H 7,4$ den Vorzug, dass die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einem Umsatz von 80 % des Nukleotids konstant bleibt, während sie bei $P_H 7,4$ schneller abnimmt.</sup>

Ferment, die Glycerinphosphorsäuredehydrase, (sog. Baranowsky-Enzym = GDH) zu Glycerophosphat reduziert. Das Gleichgewicht ruht zum grossen Teil auf der Seite des Glycerophosphats (siehe Reaktion IV).



Von den genannten Reaktionen können zwei spektrophotometrisch bestimmt werden, nämlich Reaktion III und IV. Beide können daher jeweils zusammen mit Reaktion I in einem gekoppelten Test zur Messung der Aldolaseaktivität verwendet werden. Von Warburg wurde ein derartig zusammengesetzter Test angegeben (Koppelungen I und III). Wir haben den genannten Test in geringer Modifikation wie folgt durchgeführt:

Zusammensetzung der Testlösung:

GDH ^{+) 10 mg/ccm}	= 0,01 ccm
FDP ^{+) 10 mg/ccm}	= 0,10 ccm
DPNH ₂ ^{+) 10 mg/ccm}	= 0,05 ccm
Homogenat	= 0,50 ccm
m/20 TRAP (P _H : 7,6) ⁺⁺⁾	ad 3,00 ccm

+) Fa. Boehringer und Söhne, Mannheim

++) TRAP = Triäthanolpuffer, m/20

780 mg Triäthanolamin in 100 ccm H₂O lösen, mit HCl auf gewünschten P_H-Wert einstellen.

Da GDH im Überschuss zugegeben wird, wird die Geschwindigkeit der Extinktionsabnahme nur von der Aktivität der Aldolase bestimmt.

Bei diesem Test wird das Substrat FDP erst zugesetzt, nachdem die Umwandlung der im Serum vorhandenen Brenztraubensäure in Milchsäure beendet ist.

3) Phosphatübertragendes Ferment (PÜ I)

Zur Theorie des Tests:

Die Fermentaktivität wird im zusammengesetzten optischen Test bestimmt. Diesem liegt folgendes Reaktionsschema zugrunde:



Da in diesem Test Triosephosphatdehydrase im Überschuss zugegeben wird, ist die Reaktionsgeschwindigkeit durch das im Serum vorhandene PÜ I bestimmt.

Zusammensetzung der Testlösung:
(In geringer Modifikation nach Bücher⁺⁾).

m/10 Hydrazinlösung ⁺⁺⁾	= 0,15 ccm
ATP - Lösung 10 mg/ccm	= 0,20 ccm
m/2 MgSO ₄ in 2 m KCl	= 0,10 ccm
PGADH 10 mg/ml	= 0,06 ccm
3- PGSNa- Lösung, 5 %	= 0,10 ccm
DPNH ₂ - Lösung, 10 mg/ccm	= 0,05 ccm
Homogenat	= 0,10 ccm

m/20 Triäthanolpuffer, P_H : 7,6 ad 3,00 ccm⁺⁺⁺⁾

Bei einer anfänglichen PGADH-Konzentration von nur 0,02 ccm war die Reaktionsgeschwindigkeit nicht konstant, sondern nahm, von niedrigen Werten ausgehend, rapide zu, innerhalb von 10 Minuten um etwa das 3 - 4 fache der Ausgangswerte. (Diese Anzahl unserer Versuchsergebnisse konnte daher nicht verwendet werden). Erst bei einer PGADH - Konzentration von 0,06 verlief die Reaktionsgeschwindigkeit nun schon von höheren Anfangswerten ausgehend, konstant.

4) Triosephosphatdehydrogenase = Phosphoglycerinaldehydase = oxydierendes Ferment = PGADH.

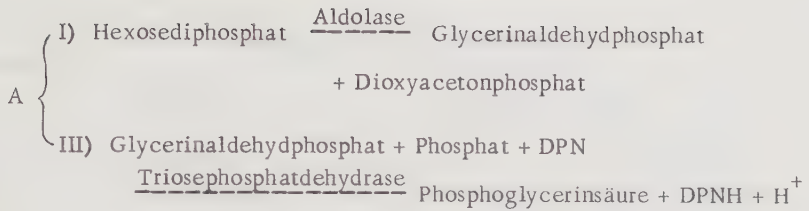
Zur Theorie des Tests:

Dem von Warburg und Christian (7) zur Bestimmung dieses Ferments angegebenen Test liegt dieselbe Reaktionsfolge zugrunde wie der Aldolasebestimmung.

⁺⁾ Herrn Professor Dr. Th. BÜCHER, physiologisch-chemisches Institut Marburg, sei für die Überlassung der Testvorschrift gedankt.

⁺⁺⁾ Hydrazinlösung m/10: (0,65 g Hydrazin, sulf. m/10 auf 50 ccm H₂O.) Sie wurde wegen geringer Stabilität alle 10 Tage frisch hergestellt und vor jedem Versuch das entsprechende Quantum neutralisiert.

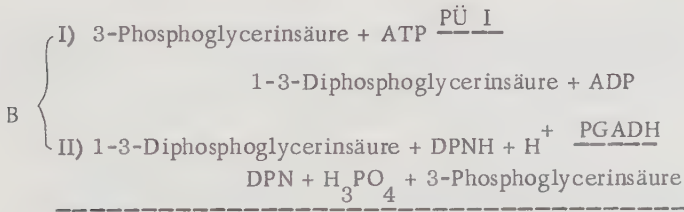
⁺⁺⁺⁾ Auch bei diesem Test wird das Substrat PGS-Na erst zugesetzt, nachdem die unspezifischen Reaktionen abgelaufen sind.



Soll die Aldolasereaktion bestimmt werden, muss Triosephosphatdehydrase im Überschuss zugesetzt werden; wenn dagegen die Aldolasekonzentration so gross gehalten wird, dass die erste Reaktion mit maximaler Geschwindigkeit abläuft, und die Reaktionsgeschwindigkeit im Test durch die Konzentration der PGADH bestimmt ist, so wird damit deren Aktivität gemessen.

Aber auch hier entspricht der gefundene Weg nicht der wahren Aktivität des Ferments, da das Substrat der PGADH, das im Reaktionsablauf gebildete Glyzerinaldehydphosphat, durch die sehr aktive Isomerase zu rasch in Dioxyacetonphosphat umgewandelt wird.

Bücher hat daher einen Rücktest zur Messung der PGADH nach folgender Gleichung angegeben:



Da im Test PÜ I im Überschuss zugesetzt wird, ergibt sich aus der Geschwindigkeitsabnahme der Lichtextinktion des DPNH die Aktivität der Triosephosphatdehydrase.

Die Aktivität des Ferments im Test B war etwa dreimal so hoch wie im Test A. Da uns PÜ I nicht in genügender Menge zur Verfügung stand, wurde versucht, ein Teil der Tests nach Test A durchzuführen. Versuche, die Reaktionsbedingungen in diesem Test durch Zusatz von Glycerophosphat (Verschiebung des Gleichgewichts der Isomerasereaktion) günstiger zu gestalten, führten zu keinem Erfolg. Die Ergebnisse nach Test A konnten daher in vorliegender Arbeit keine Verwertung finden.

Zusammensetzung der Testlösung:

3 %iges Cystein (HCl); P_H 7,0 (erst vor Gebrauch neutralisieren)	= 0,05 ccm
ATP (10 mg/ccm)	= 0,30 ccm
m/2 $MgSO_4$	= 0,04 ccm
PÜ I ⁺)	= 0,01 ccm
Phosphoglycerinsaures - Na (5 %ig) ⁺⁺⁾	= 0,10 ccm
DPNH ₂ (10 mg/ccm)	= 0,05 ccm
Homogenat	= 1,00 ccm
m/20 Triäthanolpuffer, (P_H : 7,6)	ad 3,00 ccm

Auch bei diesem Test wird das Substrat PGS - Na erst zugesetzt, nachdem die unspezif. Reaktionen abgelaufen sind.

C. Durchführung der Tests:

Die zum Test erforderlichen Lösungen ausschliesslich des Substrats werden in die Küvette gebracht und die Extinktion am Eppendorf - Photometer bei Hg - Filter 366 nm abgelesen, bis keine Änderung derselben mehr erfolgt. Dann wird das Substrat dazugegeben, ein Vorgang, der ca. 15 Sekunden in Anspruch nimmt. Anschliessend wird der Küvetteninhalt sofort gut durchgemischt und gleichzeitig die Stoppuhr in Gang gesetzt. Nach Ablauf einer Minute erfolgt die erste Messung, dann weiter jede Minute, bis zur Gesamtzahl von 8 - 12 Messungen.

^{†)} PÜ I (Herstellung: Bücher, Marburg, noch nicht im Handel) erwies sich als eine so schwer zu beschaffende Testsubstanz, dass aus diesem Grunde die Tests auf PGADH nur bei ca. der Hälfte der Fälle durchgeführt werden konnten.

⁺⁺⁾ Fa. Boehringer und Söhne, Mannheim

D. Erklärung des Photometers:

Die Fermentaktivitäten wurden mit Hilfe des Photometers "Eppendorf" bestimmt, der von Netheler und Bücher für optische Tests konstruiert wurde. Es wurde bei Schichtdicke 1 cm und Wellenlänge 366 m μ gemessen. Warburg und Bücher bevorzugen diese Wellenlänge neuerdings für optische Tests. Sie hat nach Bücher (8) gegenüber der Wellenlänge 334 m μ einige Vorteile, wie geringe Blindabsorption bei Bestimmungen in gefärbten Präparaten, leichte Isolierbarkeit mit Glasfilter in beträchtlicher Reinheit, Verwendbarkeit von Glasküvetten.

E. Berechnung der Fermentaktivitäten = (FE):

Die Berechnung erfolgt nach der von Bücher (8) für verschiedene Dehydrasen und Enzyme, die in gekoppelter Reaktion mit diesen reagieren, angegebene Aktivitätsdefinition. Danach ist eine Fermenteinheit (= 1 FE) diejenige Fermentmenge, die die DPNH - Extinktion bei 336 n m in 100 Sekunden pro Testlösung um 0,100 ändert (bei Schichtdicke 1 cm), d.h. 0,029 Mikromol pro ccm DPN umsetzt.

Also:

$$FE = \frac{\text{Gesamt volumen der Testlösung} \times 100}{\text{gestoppte Zeit in Sek.} \times \text{Volumen des zum Test einpipettierten Filtrats}}$$

(pro ccm im Homogenat)

Da das nach dieser Formel errechnete Ergebnis die Fermentaktivität pro ccm im Homogenat angibt, die Fermentaktivität in vorliegender Arbeit jedoch auf ein Gramm Muskel bezogen wird, so musste das für 1 ccm geltende FE - Ergebnis noch mit 1000 multipliziert werden, denn bei unseren Tests war

1 mg Muskel
also 1 g Muskel

= in 1 ccm Homogenat
= in 1000 ccm Homogenat

F. Einteilung der getesteten Muskelgewebe:

Die Einteilung der getesteten Muskelgewebe erfolgte nach drei Gesichtspunkten:

- 1.) Fermentaktivitäten des normalen Muskelgewebes bei verschiedenen Altersstufen.
- 2.) Vergleich der Fermentaktivitäten im
 - a) diabetischen und
 - b) nicht- diabetischen Muskelgewebe.
- 3.) Fermentaktivitäten im Muskelgewebe bei entzündlichen Vorgängen im Muskel (Osteomyelitis) und bei Durchblutungsstörungen.

G. Ergebnisse:

1.) Unter dem Gesichtspunkt verschiedener Altersstufen getestet wurde das Muskelgewebe von 29 Patienten verschiedensten Alters und verschiedener Diagnosen. Diese Patienten mussten sich alle einer Operation unterziehen, teils aus therapeutischen Gründen, teils, bei Probeexcisionen, zur Klärung unklarer Diagnosen. Geprüft wurde die Aktivität folgender vier Fermente: Milchsäuredehydrase, Aldolase, Phosphatübertragendes Ferment I und Oxydierendes Ferment.

Gruppe 1; zwischen 10 und 20 Jahren

Name und Geschlecht	Alter	Diagnose	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH	getesteter Muskel
F.H. ♂ +	14	Infarkt-Splenomegalie (20 % Hb) Operat.	2200	1980	1360	-	Bauchdecke

Gruppe 2; zwischen 20 und 30 Jahren

Name und Geschlecht	Alter	Diagnose	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH	getesteter Muskel
G.R. ♂ +	29	Stauungsgallenblase mit chron. entz. Reizzustand	2520	2210	1380	-	
		Cholecystektomie					
H.P. ♂ +	26	Cholelith.	2970	-	-	470	
		Cholecystektomie					
		<u>Mittelwerte</u>	2740	2210	1380	470	

Name und Geschlecht	Alter	Diagnose	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH	getesteter Muskel
F.G. ♂	30	Poliposis recti et coli Hemicolektomie	2160	1830	1510	-	Bauchdecke
K.J. ♀	33	Choledochus Verschluss Operat.	-	1870	-	450	Bauchdecke
S.M. ♀	38	Cholecystektomie	3080	1900	-	-	Bauchdecke
St.M. ♀	39	Cholecystopathie Cholecystektomie	3050	2200	1590	-	Bauchdecke
<u>Mittelwerte</u>			2760	1950	1550	450	

Gruppe 4: zwischen 40 und 50 Jahren

Name und Geschlecht	Alter	Diagnose	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH	getesteter Muskel
B. H. ♂	45	unklare Diagnose Probepunktion	3790	2000	-	560	Bauchdecke
B. P. ♂	42	unklare Diagnose Probeexcis.	3500	-	-	500	O'schenkel
B. A. ♀	46	Cholecystektomie	2380	1880	1340	-	Bauchdecke
D. A. ♂	48	Subphren. Abszess Flankenschnitt r.	2680	2000	1280	-	Bauchdecke
H. E. ♀	46	Cholelith. Cholecystektomie	2970	2220	-	560	Bauchdecke
M. Ch. ♂	48	unklare Diagnose Probeexcis.	-	1850	-	-	Wadenmuskel
S. Th. ♀	49	chron. Stein- chelecyst. Cholecystektomie	2490	1900	1560	-	Bauchdecke
Z. A. ♀	45	groszell. Sarkom v. Tibiakopf Ablat. fem.	3000	2240	1620	-	O'schenkel
<u>Mittelwerte</u>			2970	2010	1450	540	

Name und Geschlecht	Alter	Diagnose	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH	getesteter Muskel
F. A. ^o +	51	chron. hypertroph. Gastrit. Resekt B I	2920	2100	1190	-	Bauchdecke
Metastasen							
H. W. ^o +	54	eines prim. op. Milzarkoms Relaparatom.	3200	2180	1680	-	Bauchdecke
Cholecysto~							
M. M. ^o +	55	pathie Cholecystek- tomie	2820	2110	1290	-	Bauchdecke
S. Th. ^o +	58	Colon trans- vers. Tumor	2870	2000	-	370	Bauchdecke
<u>Mittelwerte</u>			2950	2090	1380	370	

Gruppe 6: zwischen 60 und 70 Jahren

Name und Geschlecht	Alter	Diagnose	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH	getesteter Muskel
B. Th. ♀ +	60	Nierencyst, Nephrekt.	2350	2170	1540	-	Bauchdecke
B. F. ♂ +	65	doppelt angelegte Steingallenblase Cholecystekt.	1980	1680	1460	-	Bauchdecke
D. A. ♂ +	64	Mammatu. m. Achselmetast. Ablat. mammae	2250	-	1360	-	Brustmusk.
F. J. ♂ ¹	62	Antrum-Polyp; B. II	2980	2240	-	550	Bauchdecke
G. M. ♂ +	60	Mamma-Ca., links Ablatio mammae	3380	1920	1250	-	Brustmusk.
L. L. ♂ +	68	Cholecystopathie Cholecystektomie	2450	1920	1070	-	Bauchdecke
R. M. ♂ +	65	Verd. a. Verschl. Ikt. Probelap.	2600	1850	-	300	Bauchdecke
Schr. Cr. ♀ +	69	Gallenblasenempyem Cholecystekt.	1960	1580	1170	-	Bauchdecke
S. T. ♂ +	69	Neo. ventr. Resekt.	2000	2000	-	-	Bauchdecke
V. J. ♂ ¹	67	Fremdkörperabszess mit Fistelbildung l. Lende	2120	2080	1570	-	Rückenmusk.
<u>Mittelwerte</u>			2400	1930	1340	420	

Mittelwerte der einzelnen Gruppen:

Gruppe	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH
1	2200	1980	1360	-
2	2740	2210	1380	470
3	2760	1950	1550	450
4	2970	2010	1450	540
5	2950	2090	1380	370
6	2400	1930	1340	420

2.) Zum Vergleich der FE-Aktivitäten in diabetischem und nicht-diabetischem Muskelgewebe:

Getestet wurden 29 Nicht-Diabetiker (siehe Tabellen unter Absatz 1) und 3 Diabetiker. (Die leider geringe Zahl diabetischer Fälle ist auf den niedrigen Prozentsatz diabetischer Patienten im Operationsprogramm der meisten Kliniken, so auch unserer Klinik, zurückzuführen.)

	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH
Mittelwerte von 29 nicht-diabetischen Patienten	2670	2020	1410	450
Mittelwerte von 3 Diabetikern	2400	1830	1100	750

Bei den Diabetikern handelt es sich um folgende Patienten:

- a) Pat. H.G., 48 Jahre, Cardia-CA mit Lebermetastasen. Mit Insulin vorbehandelt. MDH : 2300 FE. (Aldolase und PGADH konnten aus technischen Gründen nicht geprüft werden. Unsere Tests auf PÜ I liefen zu dieser Zeit noch nicht genau genug, um verwendbar zu sein.)
- b) Patientin S.M., 67 Jahre, Cholecystektomie, nicht eingestellt mit Insulin. MDH: 2300 FE; Aldolase: 1840 FE; PGADH: 750 FE. (Für das Fehlen von PÜ I gilt derselbe Grund wie bei Patient H.G.)
- c) Patientin H.M., 51 Jahre, unklare Diagnose, nicht eingestellt mit Insulin. MDH: 2530 FE; Aldolase: 1830 FE; PÜ I: 1100 FE. (PGADH: $\frac{1}{2}$. Mangel an Testsubstanz.)

3 a) Fermentaktivitäten im Muskelgewebe bei entzündlichen Vorgängen im Muskel (Osteomyelitis).

Name und Geschlecht	Alter	Diagnose	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH	getesteter Muskel
R. T. ♂ ¹	18	Sequestromie bei Osteomyelitis	5080	2600	-	600	O'schenkel
H. K. ♂ ¹	51	beginnende Osteomyelitis	3540	2000	-	580	O'schenkel

3 b) Fermentaktivitäten im Muskelgewebe bei Durchblutungsstörungen.

Name und Geschlecht	Alter	Diagnose	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH	getesteter Muskel
T. R. ♀ ⁺	28	Durchblutungsstörungen beider Beine Sympathekt. bds.	2300	1870	1380	-	Hüftmuskel
P. A. ♂ ¹	53	Durchblutungsstörungen des p. Beines Sympathekt. l.	2450	-	-	310	Hüftmuskel
M. A. ♀ ⁺	82	Art. fem. Verschluss Amputation des O'schenkels	650	530	-	450	O'schenkel

4.) sei noch hinzugefügt:

Ausser den Bestimmung der FE-Aktivitäten an menschlichem Muskelgewebe wurden an unserer Klinik auch Untersuchungen über Fermentaktivitäten im menschlichen Serum, in den Erythrocyten, und in der Leber durchgeführt.

Zur Übersicht folgende Tabellen:

Mittelwerte der FE-Aktivitäten im gesunden menschlichen Muskel
(Berechnet aus den Ergebnissen von 29 Patienten)

MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH
2670 FE	2020 FE	1410 FE	450 FE
100 ‰	75 ‰	52 ‰	16 ‰

Verhältnisswerte und Fermentaktivitäten in menschlichen Geweben
und Serum (für MDH = 100 ‰)

	MDH	Aldolase	PÜ I	PGADH
Serum	100	9	33	-
Ery.	100	10	46	?
Muskel	100	75	52	16
Leber	100	171	-	?

IV. DISKUSSION

1.) Bei Betrachtung der FE-Aktivitäten im menschlichen Muskel unter dem Gesichtspunkt verschiedener Altersstufen ergibt sich folgendes: Die MDH zeigt von Gruppe 1 (10 - 20 Jahre) bis Gruppe 6 (60 - 70 Jahre) Schwankungen um die Werte 2200 FE bis 2950 FE. Die Aldolase schwankt zwischen Werten von 1930 FE und 2210 FE; das phosphatübertragende Ferment zwischen Werten von 1340 FE und 1550 FE und PGADH zwischen 420 FE und 540 FE.

Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen, ausgehend von Gruppe 1 bis zu Gruppe 6, zeigen keine Erhöhung oder Erniedrigung im Sinne einer gleichmässig nach oben oder unten verlaufenden Kurve, sondern es handelt sich hier um unregelmässige Schwankungen. Da die Schwankungen gering sind, können im Rahmen einer gewissen individuellen Variationsbreite der einzelnen Fälle die Fermentaktivitäten als konstant angesehen werden. Es besteht demnach kein Unterschied in den FE-Aktivitäten des gesunden Muskelgewebes bei verschiedenen Altersstufen. Die Leistungsabnahme des alternden Menschen ist also nicht durch eine Abnahme von Enzymeiweiss bedingt.

2.) Unter dem zweiten Gesichtspunkt, dem Verhältnis der FE-Aktivitäten zwischen diabetischem und nicht-diabetischem Muskelgewebe ist zu den Ergebnissen folgendes zu sagen:

Die Gewebe des Diabetikers vermögen erst bei viel höherem Blutzuckerspiegel die Glukose mit gleicher Geschwindigkeit umzusetzen wie der normale Organismus. Nach den Ergebnissen unserer Arbeit ist eine Abnahme der Fermentaktivität nicht als Ursache der diabetischen Stoffwechselstörung anzusehen.

Die leider nur in geringer Zahl zur Verfügung stehenden Diabetiker-Fälle lassen ein eindeutiges Urteil zwar im strengen Sinne noch nicht zu, doch scheint es, dass das diabetische Muskelgewebe sich in seiner Fermentaktivität nicht vom normalen Muskelgewebe unterscheidet.

Die Mittelwerte der Fermentaktivitäten bei MDH, Aldolase und PÜ I ergeben für das diabetische Gewebe einen um ca. 10 % niedrigeren Wert gegenüber dem Mittelwert der gesunden Gewebe, doch liegt diese Größenordnung durchaus noch im Bereich der normalen Schwankungsbreite, und ist nicht als typischer Wert für diabetisches Gewebe anzusehen. Bei PGADH liegt der Wert des diabetischen um ca. 40 % höher als der des normalen Muskels. Da es sich bei diesem Wert auf Seiten der Diabetiker nur um einen einzigen Patienten handelt, um Pat. S. M., 67 Jahre, so ist nicht zu entscheiden, ob PGADH im diabetischen Muskelgewebe tatsächlich gegenüber der Norm erhöht ist (was jedoch nicht anzunehmen ist), oder ob es sich hierbei um einen weiten Streuwert im Bereich der Fehlerbreite handelt (was wohl am ehesten zutreffend erscheint). (Auf die Schwierigkeit, bzw. zeitweilige Unmöglichkeit in der Beschaffung von PÜ I - Ferment für den PGADH - Test wurde schon früher hingewiesen.)

Dieses Ergebnis würde übereinstimmen mit den Ergebnissen von Hess und Gehm (9), deren Untersuchungen über MDH-Aktivität im menschlichen Serum für Diabet. mell. (dekompensiert), dieselben Werte ergaben wie für normales, nicht-diabetisches Serum. Nur hatten die Ergebnisse von Hess und Gehm für das Serum von Diabetikern eine wesentlich grössere Streubreite (25 % - 220 % des errechneten Mittelwerts) als für das Serum von Nicht-Diabetikern, was wiederum unser von der Norm abweichendes Ergebnis bei Patient S. M. eventuell erklären würde.

3a) Zur Fermentaktivität im Muskelgewebe bei entzündlichen Vorgängen im Muskel (Osteomyelitis):

Bei Patient. R. T., 18 Jahre, Osteomyelitis, sind die Fermentaktivitäten wesentlich höher als bei sämtlichen Tests, die mit nicht-entzündetem Muskelgewebe durchgeführt worden waren. Dass die Erhöhung der Fermentaktivitäten auf dem jungen Alter des Patienten beruht, kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Die Ursache muss in der Erkrankung selbst begründet liegen. Welche Faktoren die Erhöhung der Fermentaktivitäten bei Osteomyelitis bewirken, sei allerdings noch dahingestellt. Möglicherweise produzieren die Entzündungszellen mehr Fermente, die dann im Test miterfasst werden, oder aber die Fermente der Muskelzellen selbst weisen bei Osteomyelitis gesteigerte Aktivitäten auf.

Der hier beschriebene Einzelfall sehr hoher Fermentaktivitäten der Gewebe bei stark entzündlichen Vorgängen (Osteomyelitis) kann noch nichts beweisen, doch mag er vielleicht auf eine lohnende Verfolgung dieses Problems in einer weiteren Arbeit hindeuten.

Nur der sehr ausgeprägte osteomyelitische Prozess beim Patienten R. T. ergab dèrmassen erhöhte Fermentaktivitäten. Beim Patienten H. K., 51 Jahre, mit erst beginnender Osteomyelitis, waren die MDH- und PGADH - Werte, verglichen mit den Mittelwerten der gesunden Muskelgewebe, zwar erhöht, aber bei weitem nicht so stark wie beim Patienten R. T.

3b) Zur Fermentaktivität im Muskelgewebe bei Durchblutungsstörungen.

Bei Pat. M. A. 82 Jahre, Art. femoralis-Verschluss, ist ein starkes Absinken der FE-Aktivität für MDH und Aldolase gegenüber den Werten bei gesundem Muskelgewebe festzustellen. Dass die niedrigen Werte im hohen Alter der Patientin begründet sind, ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit auszuschliessen. Doden und Hillenbrand (1) fanden, dass das Kreatinaufbauende Ferment bei Arteriosklerose- und Endangitis-Patienten wesentlich geschädigt ist. Dasselbe gilt möglicherweise auch für unseren Fall, für Patientin M. A. und für die hier untersuchten Fermente. - Die ausgedehnte Durchblutungsstörung hat eine mangelnde O_2 - Versorgung der Gewebe zur Folge. Dadurch ist der Stoff- und Energiestoffwechsel stark gebremst und es kann dadurch die Bildung von Enzymeiweiss gehemmt werden.

Patientin T. R., 28 Jahre, und Pat. P. A., 53 Jahre, könnten mit ihren Durchblutungsstörungen auch zur Gruppe der von Hillenbrand (1) erwähnten Endangitis-Patienten gezählt werden, doch zeigt sich bei diesen Patienten noch keine Verminderung in der FE-Aktivität. Der Grund mag darin liegen, dass es sich bei Pat. T. R. und Pat. T. A. um eine noch relativ geringe Gewebsschädigung gehandelt hat, während die Schädigung bei Pat. M. A. mit Art. fem. -Verschluss wesentlich weiter fortgeschritten war.

PGADH scheint stabiler zu sein als MDH und Aldolase. Seine Aktivität war im Gegensatz zu diesen beiden bei Pat. M. A. nicht erniedrigt.

Das von der Norm abweichende, ausserordentlich niedrige Ergebnis bei Pat. M. A. kann auch nicht darauf beruhen, dass bei diesem Test Ober-

schenkelmuskulatur verwendet wurde und bei den meisten anderen Tests dagegen Muskelgewebe aus der Bauchdecke. Die Tatsache, dass bei dem sehr hohen Ergebnis des Pat. R. T. ebenfalls Oberschenkelmuskulatur getestet wurde, spricht dagegen.

Die Ergebnisse der übrigen Patienten zeigen, dass kein wesentlicher Unterschied in der Fermentaktivität verschiedener Muskelpartien besteht. (Zu Tests verwendet wurde bei dieser Arbeit vorwiegend Muskulatur der Bauchdecke, daneben Rückenmuskulatur, Oberschenkelmuskulatur und Wadenmuskulatur.)

4.) Die Mittelwerte der FE-Aktivitäten im menschlichen Muskel ergaben folgende Verhältnisse:

MDH	:	Aldolase	:	PÜ I	:	PGADH
100 %	:	75 %	:	52 %	:	16 %

Damit stimmt unser Ergebnis mit den Werten überein, die K. Lang (10) in seiner Arbeit veröffentlichte. Lang fand ein Verhältnis der FE-Aktivitäten im menschlichen Muskel von MDH : PGADH = 100 : 14. (Wir fanden MDH : PGADH = 100 : 16).

Die Tabelle über Verhältnisswerte der Fermentaktivitäten im menschlichen Gewebe und Serum zeigt, dass die Aktivitäten durchaus nicht überall dieselben sind. Doch ein näheres Eingehen darauf und eine Deutung würde den Rahmen des hier gesetzten Themas übersteigen und sei anderen Arbeiten vorbehalten.

Zum Schluss noch eine Bemerkung, die die Ergebnisse im allgemeinen angeht:

K. Lang (10) betont in seiner Arbeit über "Fermentsysteme der Zelle", sehr nachdrücklich, dass die in vitro gemessenen Fermentaktivitäten durchaus nicht mit den in vivo beobachteten gleichzusetzen sind: ... "Die unter optimalen Bedingungen gemessenen Umsätze entsprechen in der Tat den theoretisch zu erwartenden. Die Umsätze in vivo sind sehr viel geringer. Nach Aufhebung aller Diffusionsschranken und Schaffung optimaler Konzentrationen bezüglich Substraten und Enzymeffektoren kann man in vitro bei Zellpräparationen Umsätze messen, die um zwei, ja drei Zehnerpotenzen grösser sind, als man sie in vivo beobachtet. Die

Zelle des tierischen Organismus arbeitet nämlich in vivo unter ungünstigen Verhältnissen hinsichtlich Substratkonzentrationen und vielleicht auch Enzymeffektoren. Es ist daher sehr wichtig, dass man sich bei allen Betrachtungen über den Zellstoffwechsel insbesondere im Zusammenhang mit Problemen der Physiologie und Pathologie des gesamten Organismus darüber im Klaren ist, dass ein grosser Unterschied zwischen den tatsächlichen und den potentiellen Enzymaktivitäten in der Zelle besteht."

Die Einschränkung, die durch diese Tatsache gegeben ist, fällt bei vorliegender Arbeit nicht ins Gewicht, da hier nicht die tatsächlichen Fermentaktivitäten interessieren, sondern ihre Verhältnisse zueinander.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit wurden aus menschlichem Muskelgewebe mit Hilfe der "Optischen Tests" von Warburg folgende Enzyme der Glykolyse bestimmt: Milchsäuredehydrase, Aldolase, Phosphatübertragendes Ferment I und Oxydierendes Ferment. Die Ergebnisse wurden unter drei verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet und miteinander verglichen.

- a) Vergleich der Fermentaktivitäten bei verschiedenen Altersstufen.
Hierbei ergab sich kein Unterschied in den Fermentaktivitäten des gesunden Muskelgewebes bei verschiedenen Lebensaltern, und es war auch kein Unterschied in der Fermentaktivität zwischen Muskelgeweben von Frauen und Männern zu verzeichnen.
- b) Das Verhältnis der Fermentaktivitäten zwischen diabetischem und nicht-diabetischem Muskelgewebe ergab ebenfalls keine Unterschiede, sondern übereinstimmende Werte zwischen dem Muskelgewebe von Diabetikern und Nicht-Diabetikern.
- c) Zur Frage der Fermentaktivitäten im Muskelgewebe bei entzündlichen Vorgängen im Muskel und bei Durchblutungsstörungen:
In einem Fall, bei fortgeschrittener Osteomyelitis, war eine ausserordentlich gesteigerte Aktivität von Milchsäuredehydrase und Aldolase festzustellen, in einem anderen Fall, bei Art. femoralis-Verschluss, ergab sich eine deutliche Erniedrigung in der Aktivität von Milchsäuredehydrase und Aldolase.
Bei erst beginnenden und noch nicht fortgeschrittenen entzündlichen Vorgängen und Durchblutungsstörungen zeigten sich dieselben Werte wie beim gesunden Muskel.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) W. Doden und H.J. Hillenbrand, Münster:
Klinische Wochenschrift, Heft 25/26. S. 433.
1951
- 2) D. Crandall und D. Halikis:
Journal of biological chemistry, 208, 629,
1954
- 3) O. Warburg, W. Christian und A. Griesse:
Biochem. Zeitung, 282, 157, 1935
- 4) Kubowitz und P. Ott: Biochem. Zeitung 314, 94, 1943
- 5) Euler und Mitarbeiter:
Hoppe Seyler's Z. für phys. Chemie, 245,
217, 1937
- 6) Meyerhof und Ohlmeyer:
Biochem. Zeitung 290, 334, 1937
- 7) O. Warburg und W. Christian:
Biochem. Zeitung 314, 149, 1943
- 8) G. Beisenherz; H.J. Bolze; Th. Bücher u.a.:
Z. Naturforschung, 555, 1953
- 9) B. Hess und E. Gehm, med.Univ.Klinik, Heidelberg:
Klinische Wochenschrift 13/14, 91, 1955
- 10) K. Lang, Mainz: "Fermentsysteme in der Zelle".
Klinische Wochenschrift 13/14, 300, 1955

VII. LEBENSLAUF

Am 8. September 1930 wurde ich, Erna, Maria, Friederike Mayer, als Tochter des Diplom-Ingenieurs Dr. Eugen Mayer und seiner Ehefrau Erna, geb. Moosmann in Stuttgart geboren.

Von 1937 bis 1941 besuchte ich die dortige Volksschule und von 1941 bis 1943 die Hölderlin-Oberschule Stuttgart, von 1943 bis 1945 die Oberschule Bietigheim/Württbg. und ab 1945 wieder die Hölderlin-Oberschule Stuttgart, an der ich 1950 das Abitur machte. Anschließend begann ich mit dem Medizin-Studium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, wo ich 1953 das medizinische Vorstaatsexamen ablegte. Die klinischen Semester hörte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im Sommer 1959 schloss ich an der Universität München mit dem medizinischen Staatsexamen ab.

